

29.10.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

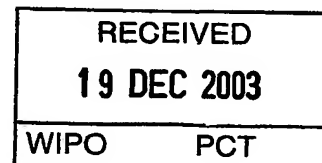
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月19日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-272976
[ST. 10/C]: [JP2002-272976]

出 願 人
Applicant(s): 鐘淵化学工業株式会社

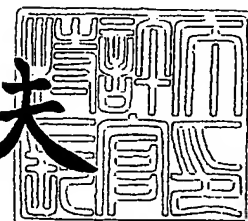


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



Best Available Copy

【書類名】 特許願
【整理番号】 TKS-4871
【提出日】 平成14年 9月19日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 9/04
C12N 15/53
C12N 15/63
C12N 1/21
C12P 7/02

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社
高砂工業所内

【氏名】 木崎 憲之

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社
高砂工業所内

【氏名】 西山 陶三

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社
高砂工業所内

【氏名】 八十原 良彦

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

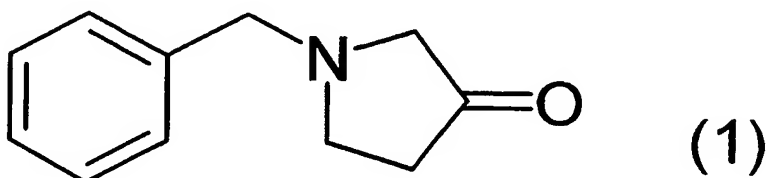
【発明の名称】 新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(1)から(4)の理化学的性質を有するポリペプチド
:

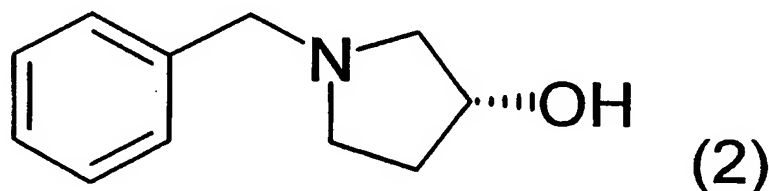
(1) 作用: NADHまたはNADPHを補酵素として、式(1)

【化1】



で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンに作用し、式(2)

【化2】



で表される(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、

(2) 作用至適pH: 5.5から6.0、

(3) 作用至適温度: 50℃から55℃、

(4) 分子量: ゲル濾過分析において約55000、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析において約28000。

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のポリペプチド:

(a) 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列または配列表の配列番号1に示したアミノ酸において1若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、前記式(1)で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して、前記式(2)で表される(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチド。

【請求項 3】ポリペプチドがデボシア (*Devosia*) 属に属する微生物に由来する請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】デボシア属に属する微生物が、デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO13584 株である請求項 3 記載のポリペプチド。

【請求項 5】請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 6】以下の (a) 又は (b) のポリヌクレオチド:

(a) 配列表の配列番号 2 に示した塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列表の配列番号 2 に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、前記式 (1) で表される N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元して、前記式 (2) で表される (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 7】請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 8】プラスミド pNTDR である請求項 7 記載の発現ベクター。

【請求項 9】グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 7 に記載の発現ベクター。

【請求項 10】前記グルコース脱水素酵素活性を有するポリペプチドがバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素である、請求項 9 に記載の発現ベクター。

【請求項 11】プラスミド pNTDRG1 である請求項 10 に記載の発現ベクター。

【請求項 12】請求項 7 から 11 のいずれかに記載の発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られた形質転換体。

【請求項 13】前記宿主細胞が大腸菌である請求項 12 に記載の形質転換体。

【請求項 14】*E. coli* HB101 (pNTDR) (FERM P-

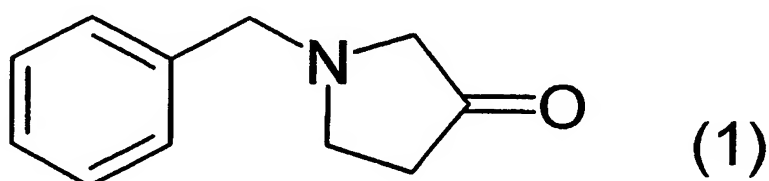
18871) である請求項13に記載の形質転換体。

【請求項15】 *E. coli* HB101 (pNTDRG1) (FERM P-18872) である請求項13に記載の形質転換体。

【請求項16】 請求項12から15のいずれかに記載の形質転換体の培養物またはその処理物を、カルボニル基を有する化合物と反応させることを特徴とする光学活性アルコールの製造方法。

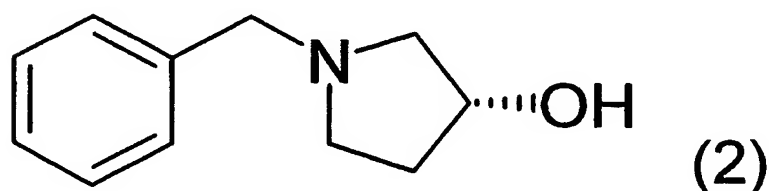
【請求項17】 前記カルボニル基を有する化合物が、式(1)

【化3】



で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンであり、前記光学活性アルコールが、式(2)

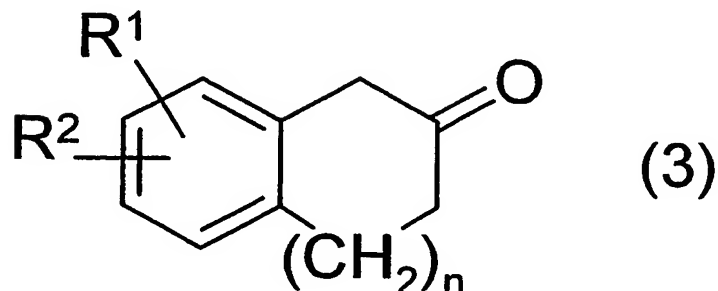
【化4】



で表される(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールである、請求項16に記載の製造方法。

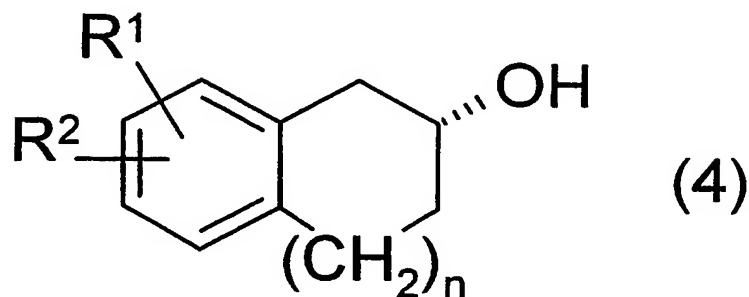
【請求項18】 前記カルボニル基を有する化合物が、一般式(3)

【化5】



(式中、 R^1 、 R^2 は水素原子、水酸基、アルコキシ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、 n は1又は2を示す。)で表される2-テトラロン誘導体であり、前記光学活性アルコールが、一般式(4)

【化6】



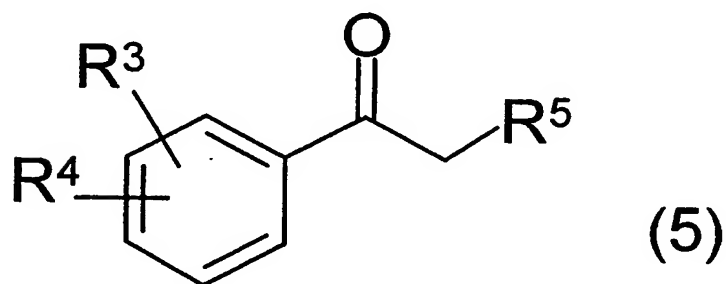
(式中、 R^1 、 R^2 及び n は前記と同じ)で表される2-テトラロール誘導体である請求項16に記載の製造方法。

【請求項19】前記2-テトラロン誘導体が7-メトキシ-2-テトラロンであり、前記2-テトラロール誘導体が(R)-7-メトキシ-2-テトラロールである請求項18に記載の製造方法。

【請求項20】前記2-テトラロン誘導体が3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オンであり、前記2-テトラロール誘導体が(R)-3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールである請求項18に記載の製造方法。

【請求項21】前記カルボニル基を有する化合物が、一般式(5)

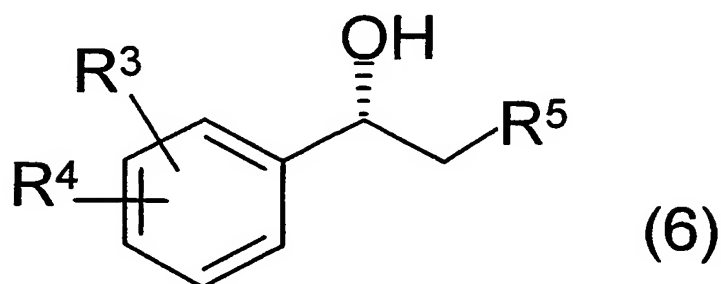
【化7】



(式中、 R^3 、 R^4 は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、ニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、 R^5 は水素原子、ハロゲン原子、水酸

基、置換基を有してもよいアルキル基を示す。) で表される 1-フェニルエタノール誘導体であり、前記光学活性アルコールが、一般式 (6)

【化 8】



(式中、R³、R⁴、及び、R⁵は前記と同じ) で表される 1-フェニルエタノール誘導体である請求項 16 に記載の製造方法。

【請求項 22】 前記 1-フェニルエタノール誘導体が 2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル) エタノールであり、前記 1-フェニルエタノール誘導体が (S)-2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル) エタノールである、請求項 21 に記載の製造方法。

【請求項 23】 前記 1-フェニルエタノール誘導体が 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールであり、前記 1-フェニルエタノール誘導体が (S)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールである請求項 21 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

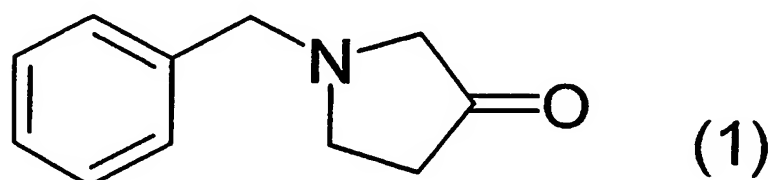
【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、式 (1)

【0002】

【化 9】

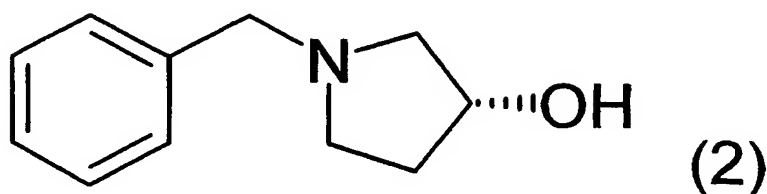


【0003】

で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを経立体選択的に還元して、式(2)

【0004】

【化10】



【0005】

で表される(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された形質転換体に関する。

【0006】

本発明はまた、該形質転換体を用いた光学活性アルコール、とりわけ光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性2-テトラロール誘導体、及び、光学活性1-フェニルエタノール誘導体の製造法に関する。光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性2-テトラロール誘導体、及び、光学活性1-フェニルエタノール誘導体は、医薬、農薬等の合成原料として有用な化合物である。

【0007】

【従来の技術】

光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法としては、N-ベンジル-3-ピロリジノンを経立体選択的に還元する活性を有する酵素の存在下、このN-ベンジル-3-ピロリジノンを経立体選択的に還元して光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法(特許文献1:特開平6-141876号公報)、N-ベンジル-3-ピロリジノンに微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法(特許文献2:特開平10-150997号公報)が知られている。

【0008】

また、光学活性 2-テトラロール誘導体の製造方法としては、ベンゼン環上に置換基を有する 2-テトラロン誘導体にパン酵母を作用させて、対応する光学活性 2-テトラロール誘導体を製造する方法（非特許文献 1: Tetrahedron 51, 11531, (1995)）が知られている。

【0009】

また、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体の製造方法としては、2-ハロ-1-（置換フェニル）エタノンに、アシビア属やオガタエ属等に属する微生物またはその処理物を作用させ、光学活性 2-ハロ-1-（置換フェニル）エタノールを得る方法（特許文献 3: 特開平 4-218384 号公報、及び、特許文献 4: 特開平 11-215995 号公報）、1-（置換フェニル）エタノンにゲオトリカム・キャンディダム（*Geotrichum candidum*）の乾燥菌体を作用させ、光学活性 1-（置換フェニル）エタノールを得る方法（非特許文献 2: J. Org. Chem. 63, 8957 (1998)）が知られている。

【0010】

しかしながら、これらの方法はいずれも、その基質仕込み濃度および基質から生成物への転換率が実用上十分ではなく、より効率の良い方法が待ち望まれていた。

【0011】

【特許文献 1】

特開平 6-141876 号公報

【0012】

【特許文献 2】

特開平 10-150997 号公報

【0013】

【特許文献 3】

特開平 4-218384 号公報

【0014】

【特許文献4】

特開平11-215995号公報

【0015】

【非特許文献1】

Tetrahedron 51, 11531, (1995)

【0016】

【非特許文献2】

J. Org. Chem. 63, 8957 (1998)

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性2-テトラロール誘導体、光学活性1-フェニルエタノール誘導体を始めとする各種光学活性アルコールの製造に有用なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された形質転換体を提供することを課題とする。

【0018】

また、本発明は、該形質転換体を用いて、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性2-テトラロール誘導体、及び、光学活性1-フェニルエタノール誘導体を始めとする各種光学活性アルコールを効率よく製造する方法を提供することを課題とする。

【0019】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元し、(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する微生物より、該活性を有するポリペプチドを単離した。そして、該ポリペプチドを利用することにより光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールのみならず、光学活性2-テトラロール誘導体及び光学活性1-フェニルエタノール誘導体を始めとする、有用な光学活性アルコールを効率良く製造することが可能であることを見出した。また、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離し、更には、発現ベ

クター並びに形質転換体を創製することにも成功し、本発明を完成するに至った。

【0020】

即ち、本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを経立体選択的に還元して、(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成し得るポリペプチドである。また、本発明は、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。また、本発明は、上記ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターである。また、本発明は、上記ポリペプチドを高生産する形質転換体である。更に、本発明は、該形質転換体を用いた、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性2-テトラロール誘導体、及び、光学活性1-フェニルエタノール誘導体を始めとする、有用な光学活性アルコールの実用的な製造方法である。

【0021】

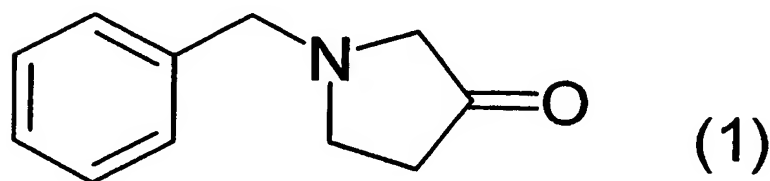
【発明の実施の形態】

以下、詳細に本発明を説明する。本発明のポリペプチドとしては、以下の(1)から(4)の理化学的性質を有するポリペプチドが挙げられる。

(1) NADHまたはNADPHを補酵素として、下記式(1)

【0022】

【化11】

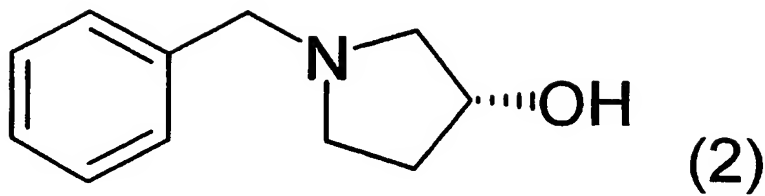


【0023】

で表されるN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体的に還元して、下記式(2)

【0024】

【化12】



【0025】

で表される (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有し、
(2) 作用至適 pH が 5.5 から 6.0、
(3) 作用至適温度が 50℃ から 55℃、
(4) 分子量が、ゲル濾過分析において約 55000、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約 28000、
であるポリペプチド。

【0026】

また、本発明のポリペプチドとしては、例えば、配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド、または、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列または配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

【0027】

配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失または付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチドは、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., 1989) 等に記載の公知の方法に準じて調製することができ、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して (R) -N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する酵素活性を有する限り本発明のポリペプチドに包含される。

【0028】

このようなポリペプチドは、当該活性を有する微生物から単離することができる。ポリペプチドの起源として用いられる微生物は、特に限定されないが、例えばデボシア (*Devosia*) 属細菌が挙げられ、特に好ましいものとしてはデボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO13584 株を挙げることができる。

【0029】

本発明のポリペプチドを生産する微生物は、野生株または変異株のいずれであってもよく、また、細胞融合または遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導された微生物であってもよい。

【0030】

遺伝子操作された本発明のポリペプチドを生産する微生物は、例えば、これらのポリペプチドを単離および／または精製してそのアミノ酸配列の一部または全部を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいてポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいてポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を得る工程、およびこのヌクレオチド配列を他の微生物に導入して組換え微生物を得る工程を包含する方法により得られ得る。

【0031】

本発明のポリペプチドを有する微生物からの該ポリペプチドの精製は、常法により行い得る。例えば、該微生物の菌体を適当な培地で培養し、培養液から遠心分離により菌体を集める。得られた菌体を例えば、超音波破碎機などで破碎し、遠心分離にて菌体残さを除き、無細胞抽出液を得る。この無細胞抽出液に、例えば、塩析（硫酸アンモニウム沈殿、リン酸ナトリウム沈殿など）、溶媒沈殿（アセトンまたはエタノールなどによる蛋白質分画沈殿法）、透析、ゲル濾過、イオン交換、逆相等のカラムクロマトグラフィー、限外濾過等の手法を単独で、または組み合わせて用いて、ポリペプチドが精製され得る。

【0032】

該酵素活性は、100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に、基質 N-ベンジル-3-ピロリジノン 5 mM、補酵素 NADH 0.25 mM および酵素を添加し、30℃ で波長 340 nm の吸光度の減少を測定することにより確認および計算す

ることができる。

【0033】

本発明のポリヌクレオチドとしては、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであればいずれも用いることができるが、例えば、配列表の配列番号2に示した塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は、配列表の配列番号2に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0034】

配列表の配列番号2に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、配列表の配列番号2に示した塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるポリヌクレオチドを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のポリヌクレオチドを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドをあげることができる。

【0035】

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0036】

ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、配列番号2に示されるポリヌクレオチドと、配列同一性が60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、最も好ましくは9

9%以上のポリヌクレオチドをあげることができ、コードされるポリペプチドがN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する限り、本発明のポリヌクレオチドに包含される。

【0037】

ここで、「配列の同一性(%)」とは、対比される2つのポリヌクレオチドを最適に整列させ、核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、またはI)が両方の配列で一致した位置の数を比較塩基総数で除し、そして、この結果に100を乗じた数値で表される。

【0038】

配列同一性は、例えば、以下の配列分析用ツールを用いて算出し得る: GCG Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, 1994年9月, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wisconsin, USA 53711; Rice, P. (1996) Program Manual for ECG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1RQ, England)、および、the ExPASy World Wide Web分子生物学用サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland)。

【0039】

本発明のポリヌクレオチドは、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有する微生物より取得することができる。該微生物として、例えばデボシア (Devosia) 属細菌が挙げられ、特に好ましいものとしてはデボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) IFO13584株を挙げることができる。

【0040】

以下に、N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元して (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノール を生成する活性を有する微生物より、本発明のポリヌクレオチドを取得する方法の例を記載するが、本発明はこれに限定されない。

【0041】

まず、精製した前記ポリペプチド、および該ポリペプチドを適当なエンドペプチダーゼで消化することにより得られるペプチド断片の部分アミノ酸配列を、エドマン法により決定する。そして、このアミノ酸配列情報をもとにヌクレオチドプライマーを合成する。次に、本発明のポリヌクレオチドの起源となる微生物より、通常のDNA単離法、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., 1989) 等に記載の方法により、該微生物の染色体DNAを調製する。

【0042】

この染色体DNAを鋳型として、先述のヌクレオチドプライマーを用いてPCRを行い、該ポリペプチド遺伝子の一部を増幅する。ここで増幅された該ポリペプチド遺伝子の一部を含むDNA断片の配列は、ジデオキシ・シーケンス法、ジデオキシ・チェイン・ターミネーション法などにより決定することができる。例えば、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer社製) およびABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer社製) を用いて行い得る。

【0043】

該ポリペプチド遺伝子の一部の塩基配列が明らかになれば、例えば、i-PCR法 (Nucl. Acids Res. 16, 8186 (1988)) によりその全体の配列を決定することができる。また、染色体DNA上で判明した該遺伝子がイントロンを含むものであった場合は、例えば、以下の方法によりイントロンを含まない成熟型遺伝子を増幅する事ができる。

【0044】

即ち、まず、該ポリヌクレオチドの起源となる微生物より、通常のヌクレオチド単離法、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc., 1989) 等に記載の方法により、該微生物のmRNAを調製する。次に、このmRNAを鋳型とし、先に判明している該遺伝子の5'末端および3'末端付近の配列を有するヌクレオチドプライマーを用いてRT-PCR法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998 (1988))により成熟型遺伝子を増幅し、その塩基配列を先と同様に決定する。

【0045】

本発明のポリヌクレオチドを宿主微生物内に導入し、それをその導入された宿主微生物内で発現させるために用いられるベクターとしては、適当な宿主微生物内で該酵素遺伝子を発現できるものであればいずれもが用いられ得る。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター、から選ばれたものが挙げられる。また、他の宿主株との間で遺伝子交換が可能なシャトルベクターであってもよい。

【0046】

このようなベクターは、通常、*lacUV5*プロモーター、*trp*プロモーター、*trc*プロモーター、*tac*プロモーター、*lpp*プロモーター、*tufB*プロモーター、*recA*プロモーター、*pL*プロモーター等の制御因子を含み、本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結された発現単位を含む発現ベクターとして好適に用いられ得る。

【0047】

本願明細書で用いる用語「制御因子」は、機能的プロモーターおよび、任意の関連する転写要素（例えば、エンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SPI部位など）を有する塩基配列をいう。

【0048】

本願明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、遺伝子が発現するように、ポリヌクレオチドが、その発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の

調節エレメントと宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。制御因子のタイプおよび種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

【0049】

本発明のヌクレオチドを有するベクターを導入する宿主細胞としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞などがあげられるが、大腸菌が特に好ましい。本発明のヌクレオチドは常法により宿主細胞に導入され得る。宿主細胞として大腸菌を用いる場合、例えば塩化カルシウム法により、本発明のヌクレオチドを導入することができる。

【0050】

本発明のポリペプチドを用いてN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生産する場合、NADH、NADPH等の補酵素が必要となる。補酵素は通常、基質と等モルを要するが、酸化された該補酵素を還元型に変換する能力（以後、補酵素再生能と呼ぶ）を有する酵素をその基質とともに、つまり補酵素再生系を、本発明のポリペプチドと組み合わせて反応を行うことにより、高価な補酵素の使用量を大幅に削減することができる。

【0051】

補酵素再生能を有する酵素としては、例えば、ヒドロゲナーゼ、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素およびグルコース脱水素酵素などを用いることが出来る。好適には、グルコース脱水素酵素が用いられる。

【0052】

上記の補酵素再生能を有する酵素は、不斉還元反応系に別途添加することによっても行われ得るが、本発明のポリヌクレオチド、および補酵素再生能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの両者により形質転換せしめられた形質転換体を触媒として用いた場合、補酵素再生能を有する酵素を別に調製し反応系に添加することなしに、該反応を効率良く実施し得る。

【0053】

このような形質転換体は、本発明のポリヌクレオチド、および補酵素再生能を有するポリペプチド（例えば、グルコース脱水素酵素）をコードするポリヌクレオチドを、同一のベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入することにより得られる他、これら2種のポリヌクレオチドを不和合性グループの異なる2種のベクターにそれぞれ組み込み、それら2種のベクターを同一の宿主細胞に導入することによっても得られる。

【0054】

形質転換体中の補酵素再生能を有する酵素の活性は常法により測定することができる。例えば、グルコース脱水素酵素活性は、1 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に、基質グルコース 0.1 M、補酵素 NADP 2 mM および酵素を添加し、25℃で波長 340 nm の吸光度の増加を測定することにより行い得る。

【0055】

本発明の形質転換体を用いた光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノール、光学活性 2-テトラロール誘導体、及び、光学活性 1-フェニルエタノール誘導体等の光学活性アルコールの生産は以下のように実施され得る。

【0056】

まず、適当な溶媒中に基質となるカルボニル基を有する化合物、NADH 等の補酵素、および該形質転換体の培養物またはその処理物等を添加し、pH 調整下、攪拌して反応させる。

【0057】

形質転換体の培養は、その微生物が増殖する限り、通常の、炭素源、窒素源、無機塩類、有機栄養素などを含む液体栄養培地を用いて行い得る。

【0058】

ここで形質転換体の処理物等とは、例えば、粗抽出液、培養菌体、凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、あるいはそれらの磨砕物等を意味する。さらにそれらは、ポリペプチド自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いられ得る。

【0059】

また、本反応を行う際、形質転換体として本発明のポリペプチドと補酵素再生

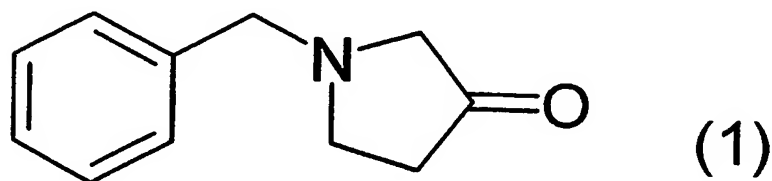
能を有する酵素（例えば、グルコース脱水素酵素）の両者を生産するものを用いる場合、反応系に補酵素再生のための基質（例えば、グルコース）を添加することにより、補酵素の使用量を大幅に減らすことが可能である。

【0060】

基質となる化合物としては、例えば、式（1）

【0061】

【化13】

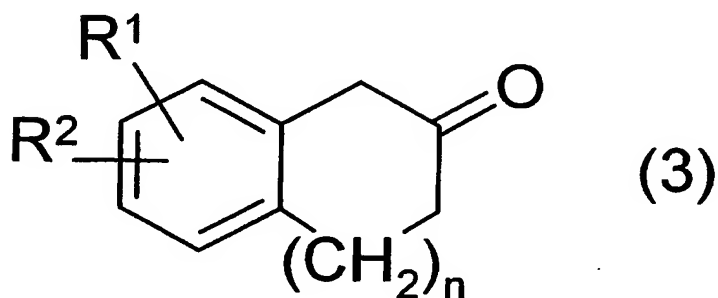


【0062】

で表される N-ベンジル-3-ピロリジノン、一般式（3）

【0063】

【化14】

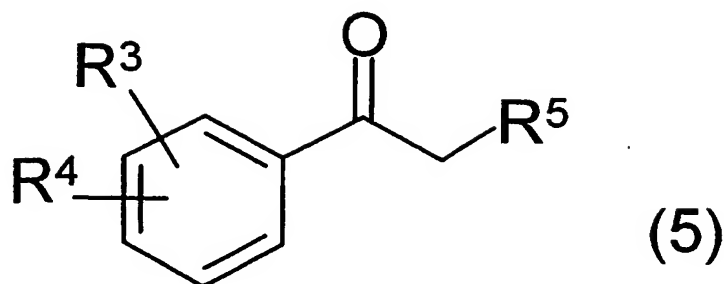


【0064】

（式中、R¹、R²は水素原子、水酸基、アルコキシ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、nは1又は2を示す。）で表される 2-テトラロン誘導体、及び、一般式（5）

【0065】

【化15】



【0066】

(式中、 R^3 、 R^4 は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、ニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なってもよい。また、 R^5 は水素原子、ハロゲン原子、水酸基、置換基を有してもよいアルキル基を示す。) で表される1-フェニルエタノン誘導体を挙げることができる。より詳しくは、例えば、7-メトキシ-2-テトラロン、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オン、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノン、及び2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンを挙げることができる。

【0067】

反応には水系溶媒を用いてもよいし、水系と有機系の溶媒を混合して用いてもよい。反応は10℃～70℃の温度で行われ、反応中反応液のpHは4～10に維持する。反応はバッチ方式あるいは連続方式で行われ得る。バッチ方式の場合、反応基質は0.1%から70% (w/v) の仕込み濃度で添加される。

【0068】

反応で生じた光学活性アルコールは常法により精製し得る。例えば、反応で生じた光学活性アルコールがN-ベンジル-3-ピロリジノール、7-メトキシ-2-テトラロール、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オール、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノール、又は、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールである場合、必要に応じ遠心分離、濾過などの処理を施して反応物から菌体等の懸濁物を除去した後、抽出に適したpHに調整し、酢酸エチル、トルエン等の有機溶

媒で抽出し、有機溶媒を減圧下で除去する。さらに、蒸留、晶析またはクロマトグラフィー等の処理を行うことにより、精製され得る。

【0069】

N-ベンジル-3-ピロリジノン、及び、N-ベンジル-3-ピロリジノールの定量は、ガスクロマトグラフィー（カラム：Unipor t B 10%PEG-20M（3.0mmID×1.0m）、カラム温度：200℃、キャリアガス：窒素、検出：FID）で行い得る。

【0070】

また、N-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：Chiralcel OB（ダイセル化学工業社製）、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール／ジエチルアミン＝99／1／0.1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行い得る。

【0071】

7-メトキシ-2-テトラロン、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オン、7-メトキシ-2-テトラロール、及び、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールは、高速液体クロマトグラフィー（カラム：ナカライテスク株式会社製COSMOSIL 5C8-MS（ID4.6mm×250mm）、溶離液：水／アセトニトリル＝1／1、流速：1ml/min、検出：210nm、カラム温度：室温）で行い得る。

【0072】

また、7-メトキシ-2-テトラロール、及び、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製Chiralcel OJ（ID4.6mm×250mm）、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール＝9／1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行い得る。

【0073】

2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノン、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノン、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノール、及び、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの定量は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：株式会社ワイエムシイ製 YMC-Pack ODS A-303 (ID 4.6 mm × 250 mm)、溶離液：水/アセトニトリル = 1/1、流速：1 ml/min、検出：210 nm、カラム温度：室温）で行い得る。

【0074】

また、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノール、及び、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製 Chiralcel OJ (ID 4.6 mm × 250 mm)、溶離液：n-ヘキサン/イソプロパノール = 39/1、流速：1 ml/min、検出：254 nm、カラム温度：室温）で行い得る。

【0075】

以上のように、本発明に従えば、本発明のポリペプチドの効率的生産が可能であり、それを利用することにより、種々の有用な光学活性アルコールの優れた製造法が提供される。

【0076】

【実施例】

以下、実施例で本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、以下の実施例において用いた組換え DNA 技術に関する詳細な操作方法などは、次の成書に記載されている。

Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、
Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)

【0077】

実施例 1 酵素の精製

以下の方法に従って、デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO13584 株より N-ベンジル-3-ピロリジノン を立体選択的に還元して (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノール を生成する活性を有する酵素を単一に精製した。特に断りのない限り、精製操作は 4℃ で行った。

【0078】

(デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO13584 株の培養)

2 L 容坂口フラスコ 72 本に下記の組成からなる液体培地 400 ml を分注し、120℃ で 20 分間蒸気殺菌をおこなった。

培地組成 (% は (w/v) で表示) :

ポリペプトン	1.0 %
イーストエキス	0.3 %
肉エキス	0.3 %
モルトエキス	1.0 %
NaCl	0.3 %
アデカノール LG-109 (日本油脂製)	0.003 %

水道水

pH 7.0

この培地に、予め同培地にて前培養しておいたデボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO13584 株の培養液を 5 ml ずつ接種し、30℃ で、48 時間振とう培養した。

【0079】

(無細胞抽出液の調整)

上記の培養液 28000 ml から遠心分離により菌体を集めた後、生理食塩水で菌体を洗浄し、該菌株の湿菌体 363 g を得た。この湿菌体を 500 ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、SONIFIER 250 型超音波破碎機 (BRANSON 社製) を用いて破碎した。破碎物から遠心分離にて菌体残渣を除き、無細胞抽出液 840 ml を得た。

【0080】

(無細胞抽出液の熱処理および酸処理)

上記の無細胞抽出液を入れたビーカーを60℃の恒温水槽に浸け、25分間攪拌した後、氷浴中で4℃まで冷却した。生じた沈殿物を遠心分離にて除いた後、この遠心上清のpHをリン酸を用いて5.0に調整し、氷浴中で3時間攪拌した。生じた沈殿物を再度遠心分離にて除き、粗酵素液830mlを得た。

【0081】

(硫酸アンモニウム分画)

上記で得た粗酵素液のpHをアンモニア水を用いて7.0に調整した後、35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加、溶解し、生じた沈殿を遠心分離により除いた(この際無細胞抽出液のpHをアンモニア水でpH7.0に維持しながら行った)。先と同様pH7.0を維持しながら、この遠心上清に55%飽和となるようさらに硫酸アンモニウムを添加、溶解し、生じた沈殿を遠心分離により集めた。この沈殿を50mlの10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した後、同一緩衝液で1夜透析し、粗酵素液83mlを得た。

【0082】

(DEAE-TOYOPEARLカラムクロマトグラフィー)

上記で得られた粗酵素液のpHをアンモニア水を用いて8.0に調整した。これを、10mMリン酸緩衝液(pH8.0)で予め平衡化したDEAE-TOYOPEARL 650M(東ソー株式会社製)カラム(250ml)に供し、同一緩衝液で活性画分を溶出させた。活性画分を集め、リン酸を添加してpH7.0に調製した。

【0083】

(Phenyl-TOYOPEARLカラムクロマトグラフィー)

上記で得られた粗酵素液に終濃度1Mとなるよう硫酸アンモニウムを溶解し(この際、アンモニア水を添加してpH7.0に維持しながら行った)、1Mの硫酸アンモニウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で予め平衡化したPhenyl-TOYOPEARL 650M(東ソー株式会社製)カラム(100ml)に供し、活性画分を吸着させた。同一緩衝液でカラムを洗浄した後、

硫酸アンモニウムのリニアグラジエント（1 Mから0 Mまで）により活性画分を溶出させた。活性画分を集め、10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）にて1夜透析を行い、電気泳動的に単一の精製酵素標品を得た。以後、この酵素をRDRと呼ぶことにする。

【0084】

実施例2 酵素の性質の測定

得られたRDRの酵素学的性質について検討した。酵素活性の測定は、基本的には、100 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）に、基質N-ベンジル-3-ピロリジノン5 mM、補酵素NADH 0.25 mMおよび酵素を添加し、30℃で1分間反応させ、波長340 nmの吸光度の減少を測定することにより行った。

(1) 作用

NADHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用し、光学純度99.9% ee以上の(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成した。NADPHを補酵素として上記方法に準じて酵素活性を測定した場合、NADHを補酵素とした場合の約0.6%の活性を示した。

(2) 作用至適pH

緩衝液として100 mMリン酸緩衝液および100 mM酢酸緩衝液を用いて、pH 4.0から8.0の範囲で、上記方法で酵素活性を測定した。その結果、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用する至適pHは5.5から6.0であった。

(3) 作用至適温度

20℃から60℃の温度で、N-ベンジル-3-ピロリジノンを基質とした場合の本酵素の活性を、1分間の反応で測定した。その結果、至適温度は50℃から55℃であった。

(4) 分子量

溶離液として150 mMの塩化ナトリウムを含む50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を用い、TSK-GEL G3000 SWXLカラム（東ソー株式会社製）による精製酵素のゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った結果、標準タンパク質との相対保持時間から算出した本酵素の分子量は約55000であった。

。また、酵素のサブユニットの分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、標準タンパク質との相対移動度から算出した。本酵素のサブユニットの分子量は約 28000 であった。

【0085】

実施例 3 RDR 遺伝子のクローニング

(PCR プライマーの作成)

実施例 1 で得られた精製 RDR を 8 M 尿素存在下で変性した後、アクロモバクター由来のリシルエンドペプチダーゼ（和光純薬工業株式会社製）で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列を ABI 492 型プロテインシーケンサー（パーキンエルマー社製）により決定した。このアミノ酸配列をもとに、DNA プライマー 2 種（プライマー 1: 5' ATGCARGAYTTYTCNGGNA 3'、プライマー 2: 5' GTDATRTTRCTNGCNGCRTC 3'）を常法に従って合成した。

【0086】

(PCR による RDR 遺伝子の増幅)

デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO 13584 株の培養菌体から Murray 等の方法 (Nucl., Acids Res. 8: 4321-4325 (1980)) に従って染色体 DNA を抽出した。次に、上記で調製した DNA プライマーを用い、得られた染色体 DNA を鋳型として PCR を行ったところ、RDR 遺伝子の一部と考えられる約 700 bp の DNA 断片が増幅された。(PCR は、DNA ポリメラーゼとして TaKaRa Ex Taq (宝酒造株式会社製) を用いて行い、反応条件はその取り扱い説明書に従った。) この DNA 断片を、プラスミド pT7Blue T-Vector (Novagen 社製) にクローニングし、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) および ABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer 社製) を用いてその塩基配列を確認した。

【0087】

(i-PCR法によるRDR遺伝子の全長配列の決定)

デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO 13584株の染色体DNAを制限酵素EcoRIで完全消化し、得られたDNA断片の混合物をT4リガーゼにより分子内環化させた。これを鋳型として用い、前項で判明したRDR遺伝子の部分塩基配列情報をもとに、i-PCR法 (*Nucl. Acids Res.* 16, 8186 (1988)) により、染色体DNA上のRDR遺伝子の全塩基配列を決定した (PCRは、DNAポリメラーゼとしてTakara Ex Taq (宝酒造株式会社製) を用いて行い、反応条件はその取り扱い説明書に従った。また、塩基配列の決定は先と同様に行った)。その塩基配列を図1に示した。また、塩基配列がコードするアミノ酸配列を塩基配列の下段に示した。このアミノ酸配列と、精製RDRのリジルエンドペプチダーゼ消化断片の部分アミノ酸配列を比較した結果、精製RDRの部分アミノ酸配列は全て、このアミノ酸配列中に存在した。図1中のアミノ酸配列において、精製RDRの部分アミノ酸配列と一致した部分には下線を付した。

【0088】

実施例4 RDR遺伝子を含む組換えプラスミドの作製

実施例3で決定された塩基配列を基に、RDR遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加したN末端DNAプライマー (5' GAGTCATATGTCC CAGGATTTTTCAGGCA 3')、および同遺伝子の3'末端の直後にEcoRI部位を付加したC末端DNAプライマー (5' GGCAGAAATTCCTATTGGGCGACGTAGCCG 3') を合成した。次に、この2種のDNAをプライマーとして用い、実施例3で調製したデボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO13584株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、開始コドン部分にNdeI部位を付加し、3'末端の直後にEcoRI切断点を付加した、RDR遺伝子を増幅した。(PCRは、DNAポリメラーゼとしてTakara Ex Taq (宝酒造株式会社製) を用いて行い、反応条件はその取り扱い説明書に従った。) これを、NdeIおよびEcoRIで消化し、プラスミドpUCNT (WO94/03613) のlacプロモーターの下流のNdeI-EcoRI部位に挿入することにより、

組換えプラスミド pNTDR を得た。

【0089】

実施例 5 RDR 遺伝子およびグルコース脱水素酵素遺伝子の両者を含む組換えプラスミドの作製

バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) IAM 1030 株由来のグルコース脱水素酵素 (以後、GDH と称する) の遺伝子の塩基配列情報 (Eur. J. Biochem. 186, 389 (1989)) を基に、GDH の構造遺伝子の開始コドンから 5 塩基上流に大腸菌の Shine-Dalgarno 配列 (9 塩基) を、さらにその直前に EcoRI 切断点を付加した N 末端 DNA プライマー (5' GCCGAATTCTAAGGAGGTTAACAATGTATAAA 3') と、GDH の構造遺伝子の終始コドンの直後に SalI 部位を付加した C 末端 DNA プライマー (5' GCGGTCGACTTATCCGCGTCCTGCTTGG 3') を常法に従って合成した。これら 2 つの DNA プライマーを用い、プラスミド pGDK1 (Eur. J. Biochem. 186, 389 (1989)) を鋳型として PCR により二本鎖 DNA を合成した。この DNA 断片を EcoRI および SalI で消化し、プラスミド pUCNT (WO94/03613) の lac プロモーターの下流の EcoRI-SalI 部位に挿入することにより、組換えプラスミド pNTG1 を得た。次に、実施例 3 で調製した pNTDR を NdeI および EcoRI で消化して得られる RDR 遺伝子を、この pNTG1 上の GDH 遺伝子上流に存在する NdeI-EcoRI 部位に挿入し、プラスミド pNTDRG1 を得た。pNTDRG1 の作製法および構造を図 2 に示す。

【0090】

実施例 6 組換え大腸菌の作製

実施例 4 および 5 で得た組換えプラスミド pNTDR および pNTDRG1 を用いて大腸菌 HB101 (宝酒造株式会社製) を形質転換し、組換え大腸菌 HB101 (pNTDR) および HB101 (pNTDRG1) を得た。こうして得られた形質転換体 HB101 (pNTDR) および HB101 (pNTDRG1) は、それぞれ、受託番号 FERM P-18871 および FERM P-18

872として独立行政法人産業技術総合研究所に寄託されている。

【0091】

実施例7 組換え大腸菌におけるRDRの生産

実施例6で得た組換え大腸菌HB101 (pNTDR) を $120 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む $2 \times \text{YT}$ 培地で培養し、遠心分離により集菌後、 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し、UH-50型超音波ホモゲナイザー (SMT社製) を用いて破碎し、無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液のRDR活性を以下のように測定した。RDR活性の測定は、 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に、基質N-ベンジル-L-ピロリジノン 5 mM 、補酵素NADH 0.25 mM および酵素を添加し、 30°C で波長 340 nm の吸光度の減少を測定することにより行った。この反応条件において、1分間に $1 \mu\text{mol}$ のNADHをNADに酸化する酵素活性を1 unit と定義した。この様に測定した無細胞抽出液中のRDR活性を比活性として表し、ベクタープラスミドを保持する形質転換体と比較した。また、実施例1と同様の方法で調製したデボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IF013584株の無細胞抽出液中のRDR活性についても同様に比較した。それらの結果を表1に示す。大腸菌HB101 (pNTDR) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT) と比較して明らかなRDR活性の増加が見られ、デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IF013584株と比較して、比活性は約17倍に達した。

【0092】

【表1】

菌株名	RRG比活性 (U/mg)
<i>E. coli</i> HB101 (pUCNT)	<0.01
<i>E. coli</i> HB101 (pNTDR)	0.67
<i>Devosia riboflavina</i> IF013584	0.04

【0093】

実施例 8 組換え大腸菌における RDR および GDH の同時生産

実施例 6 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTDRG1) を、実施例 7 と同様に処理して得られる無細胞抽出液の GDH 活性を、以下のように測定した。GDH 活性の測定は 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に、基質グルコース 0.1 M、補酵素 NADP 2 mM 及び酵素を添加し、25℃ で波長 340 nm の吸光度の増加を測定することにより行った。この反応条件において、1 分間に 1 μ mol の NADP を NADPH に還元する酵素活性を 1 unit と定義した。また、RDR 活性についても実施例 7 と同様に測定した。このように測定した無細胞抽出液中の RDR および GDH 活性を比活性として表し、大腸菌 HB101 (pNTDR) およびベクターのみの形質転換体 HB101 (pUCNT) と比較した結果を表 2 に示す。大腸菌 HB101 (pNTDRG1) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌 HB101 (pUCNT) と比較して、明らかな RDR および GDH 活性の増加が見られた。

【0094】

【表 2】

菌株名	RRG 比活性 (U/mg)	GDH 比活性 (U/mg)
<i>E. coli</i> HB101 (pUCNT)	<0.01	<0.01
<i>E. coli</i> HB101 (pNTDR)	0.67	<0.01
<i>E. coli</i> HB101 (pNTDRG1)	0.47	111

【0095】

実施例 9 RDR およびグルコース脱水素酵素を同時生産させた組換え大腸菌を用いた N-ベンジル-3-ピロリジノンからの (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールの合成

実施例 8 で得られた組換え大腸菌 HB101 (pNTDRG1) の培溶液を、SONIFIRE 250 (BRANSON 社製) を用いて超音波破碎した。この菌体破碎液 20 ml にグルコース 2 g、NAD 1 mg、N-ベンジル-3-ピロリジノン 1 g を添加した。この反応液を、5 M の塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を添加することにより pH 6.5 に調整しつつ、窒素雰囲気下、30℃ で

18時間攪拌した。反応終了後、5Mの水酸化ナトリウム水溶液2mlを添加し、反応液をトルエンで抽出した。抽出液をエバポレーターで脱溶剤した後、抽出物の分析を行ったところ、収率96%でN-ベンジル-3-ピロリジノールが得られた。この際、生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールは光学純度99.9% eeのR体であった。

N-ベンジル-3-ピロリジノン、及び、N-ベンジル-3-ピロリジノールの定量は、ガスクロマトグラフィー（カラム：Unipor t B 10%PEG-20M（3.0mmID×1.0m）、カラム温度：200℃、キャリアガス：窒素、検出：FID）で行った。また、N-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：Chiralcel OB（ダイセル化学工業社製）、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール／ジエチルアミン＝99／1／0.1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行った。

【0096】

実施例10 RDRおよびグルコース脱水素酵素を同時生産させた組換え大腸菌を用いた7-メトキシ-2-テトラロンからの（R）-7-メトキシ-2-テトラロールの合成

実施例9で得られた組換え大腸菌HB101（pNTDRG1）の培養液20mlにグルコース3g、NAD2mg、7-メトキシ-2-テトラロン2gを添加し、5Mの水酸化ナトリウム水溶液の滴下によりpH6.5に調整しつつ、窒素雰囲気下、30℃で15時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、7-メトキシ-2-テトラロール1.7gを得た。光学純度を測定した結果、生成した7-メトキシ-2-テトラロールは光学純度99.9% eeのR体であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ ppm 1.62 (s, 1H), 1.73~1.87 (m, 1H), 1.98~2.08 (m, 1H), 2.70~2.81 (m, 2H), 2.88 (app dt, 1H), 3.05 (dd, 1H) 3.76 (s, 3H), 4.09~4.19 (m, 1H), 6.61 (d, 1H), 6.69 (dd, 1H), 7.00 (d, 1H)

7-メトキシ-2-テトラロン、及び、7-メトキシ-2-テトラロールの定量は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：ナカライテスク株式会社製COSMOSIL 5C8-MS（ID4.6mm×250mm）、溶離液：水／アセトニトリル＝1／1、流速：1ml/min、検出：210nm、カラム温度：室温）で行った。また、7-メトキシ-2-テトラロールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製Chiralcel OJ（ID4.6mm×250mm）、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール＝9／1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行った。

【0097】

実施例11 RDRおよびグルコース脱水素酵素を同時生産させた組換え大腸菌を用いた3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オンからの(R)-3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールの合成

実施例9で得られた組換え大腸菌HB101（pNTDRG1）の培養液20mlにグルコース3g、NAD2mg、50%（w/w）の3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オントルエン溶液4gを添加し、5Mの水酸化ナトリウム水溶液の滴下によりpH6.5に調整しつつ、窒素雰囲気下、30℃で18時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オール1.6gを得た。光学純度を測定した結果、生成した3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールは光学純度99.9% eeのR体であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ ppm 1.40～1.65 (m, 2H), 1.70～1.95 (m, 2H), 1.95～2.20 (m, 1H), 2.65～2.75 (m, 2H), 2.90～3.10 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.65～3.90 (m, 1H), 6.66 (dd, 1H), 6.73 (d, 1H), 6.98 (d, 1H)

3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オン、及び、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールは、高速液体クロマトグラフィー（カラム：ナカライテスク株式会社製COSMOSIL 5C8-MS (ID4. 6mm×250mm)、溶離液：水／アセトニトリル＝1／1、流速：1ml/min、検出：210nm、カラム温度：室温）で行った。また、3-メトキシ-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-6-オールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（カラム：ダイセル化学工業株式会社製Chiralcel OJ (ID4. 6mm×250mm)、溶離液：n-ヘキサン／イソプロパノール＝9／1、流速：1ml/min、検出：254nm、カラム温度：室温）で行った。

【0098】

実施例12 RDRおよびグルコース脱水素酵素を同時発現させた組換え大腸菌を用いた2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノンからの(S)-2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールの合成

実施例9で得られた組換え大腸菌HB101 (pNTDRG1) の培養液50mlにグルコース10g、NAD5mg、及び、50% (w/w) の2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールトルエン溶液10gを添加し、5Mの水酸化ナトリウム水溶液の滴下によりpH6.5に調整しつつ、30℃で22時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、蒸留(110℃, 0.8mmHg)し、無色オイル状の2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノール4.1gを得た。光学純度を測定した結果、生成した2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールは光学純度99.9% eeのS体であった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm 3.10 (s, 1H), 3.61 (dd, 1H), 3.70 (dd, 1H), 4.88 (dd, 1H) 7.06 (m, 2H), 7.35 (m, 2H)

2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノン、及び、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル)エタノールの定量は、高速液体クロマトグラフ

イー (カラム: 株式会社ワイエムシィ製 YMC-Pack ODS A-303 (ID 4.6 mm × 250 mm)、溶離液: 水/アセトニトリル = 1/1、流速: 1 ml/min、検出: 210 nm、カラム温度: 室温) で行った。

また、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル) エタノールの光学純度の測定は、高速液体クロマトグラフィー (カラム: ダイセル化学工業株式会社製 Chiralcel OJ (ID 4.6 mm × 250 mm)、溶離液: n-ヘキサン/イソプロパノール = 39/1、流速: 1 ml/min、検出: 254 nm、カラム温度: 室温) で行った。

【0099】

実施例 13 RDR およびグルコース脱水素酵素を同時発現させた組換え大腸菌を用いた 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノンからの (S)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールの合成

実施例 9 で得られた組換え大腸菌 HB101 (pNTDRG1) の培養液 50 ml にグルコース 10 g、NAD 5 mg、及び、50% (w/w) の 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノントルエン溶液 10 g を添加し、5 M の水酸化ナトリウム水溶液の滴下により pH 6.5 に調整しつつ、30℃で 22 時間攪拌した。この反応液をトルエンで抽出し、脱溶剤した後、抽出物の分析を行った。その結果、収率 97% で 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールが得られた。この際、生成した 2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールは光学純度 99.9% ee の S 体であった。

2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノン、及び、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールの定量は、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル) エタノン、及び、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル) エタノールの場合と同様に行った。また、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル) エタノールの光学純度の測定は、2-クロロ-1-(4'-フルオロフェニル) エタノールの場合と同様に行った。

【0100】

実施例 14 RDR の基質特異性

0.33% (v/v) のジメチルスルフォキシドを含む 100 mM リン酸緩衝

液 (pH 6.5) に、基質となる各種カルボニル化合物を終濃度 1 mM、補酵素 NADH を終濃度 0.25 mM となるようそれぞれ溶解した。これに RDR を添加し、30℃ で波長 340 nm の吸光度の減少を測定した。この反応条件において、1 分間に 1 μ mol の NADH を NAD に酸化する酵素活性を 1 unit と定義した。そして、各種カルボニル化合物に対する活性を、N-ベンジル-3-ピロリジノンに対する活性を 100% とした場合の相対値で表し、表 3 に示した。RDR は非常に広範なカルボニル化合物に対して還元活性を示した。

【0101】

【表 3】

還元酵素RDRの基質特異性

反応基質	活性比 (%)	反応基質	活性比 (%)
N-benzyl-3-pyrrolidinone	100	N-benzyl-3-pyrrolidinone	100
2-acetylpyridine	13	ethyl 4-chloroacetoacetate	683
3-acetylpyridine	788	n-octyl 4-chloroacetoacetate	224
4-acetylpyridine	6448	ethyl 4-bromoacetoacetate	4099
2-acetylpyrrole	70	ethyl 4-azideacetoacetate	804
acetophenone	181	ethyl 4-hydroxyacetoacetate	1774
m-hydroxyacetophenone	61	ethyl 4-benzyloxyacetoacetate	3186
m-nitroacetophenone	6927	ethyl 4-acetoxyacetoacetate	4234
p-chloroacetophenone	2354	benzyl acetoacetate	2015
4-fluoroacetophenone	366	ethyl benzoylacetate	98
3,4-dimethoxyacetophenone	2073	ethyl 2-chloro-3-oxo-3-phenylpropionate	52
p-methylacetophenone	521	benzaldehyde	21
2-hydroxyacetophenone	30	2-pyridinecarbaldehyde	82
2-chloro-1-(3'-chlorophenyl)ethanone	463	pyridine-4-aldehyde	441
1-phenyl-2-butanone	147	o-chlorobenzaldehyde	9
propiophenone	27	m-chlorobenzaldehyde	301
benzoin	13	p-chlorobenzaldehyde	117
benzylacetone	410	o-nitrobenzaldehyde	33
ethyl benzoylacetate	98	m-nitrobenzaldehyde	683
acetone	194	p-nitrobenzaldehyde	1296
2-butanone	280	propionaldehyde	204
2-hexanone	5043	n-butylaldehyde	728
2-heptanone	2777	n-hexylaldehyde	2225
diethyl ketone	32	2-phenylpropionaldehyde	706
chloroacetone	4170	3-phenylpropionaldehyde	685
hydroxyacetone	100	methyl glyoxal	345
4-hydroxy-2-butanone	33	glutaraldehyde	1339
diacetyl	1614	7-methoxy-2-tetralone	7084
acetylacetone	1354	6-methoxy-2-tetralone	156
4-methyl-2-pentanone	962	6,7-dimethoxy-2-tetralone	2267
cyclopropyl methyl ketone	20	2-tetralone	1721
cyclopentanone	103	2-keto-n-butyric acid	15
dihydro-4,4-dimethyl-2,3-furandione	1314	oxalacetic acid	14
ethyl 3-oxocyclopentanecarboxylate	87	levulinic acid	11
methyl pyruvate	1889		
ethyl pyruvate	6232		
methyl acetoacetate	8341		
ethyl acetoacetate	4236		
tert-butyl acetoacetate	5634		
ethyl 2-methylacetoacetate	239		
ethyl 2-chloroacetoacetate	8907		
ethyl 2-eneacetoacetate	429		
ethyl 2-oxodecanoate	18		

【0102】

【発明の効果】

N-ベンジル-3-ピロリジノン立体選択的に還元して(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する活性を有するポリペプチド遺伝子のクローニング、およびそのヌクレオチド配列の解析により、該ポリペプチド産生能の高い形質転換体を得ることが可能になった。また、該ポリペプチドおよびグルコース脱水素酵素を同時に高生産する能力を有する形質転換体をも得ることが可能になった。さらに、これらの形質転換体を用いることにより、種々のカルボニル化合物から光学活性アルコールを効率良く合成することが可能となった。

【0103】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

<120> 新規カルボニル還元酵素、その遺伝子、およびその利用法

<130> TKS-4871

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 250

<212> PRT

<213> Devosia riboflavina

<400> 1

Met Ser Gln Asp Phe Ser Gly Lys Val Ala Phe Val Thr Gly Gly Ala
1 5 10 15
Ser Gly Ile Gly Glu Ala Val Val Lys Gln Leu Ala Ala Arg Gly Ala
20 25 30
Lys Val Val Val Ala Asp Leu Lys Leu Glu Gly Ala Gln Ala Val Ala
35 40 45
Asp Ala Val Lys Ala Ala Gly Gly Glu Ala Ala Ala Val Ala Val Asp
50 55 60
Val Ala Lys Ala Asp Gln Val Glu Lys Ala Val Gln Phe Ala Val Asp
65 70 75 80
Thr Phe Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95
Ala Ser Ala Pro Leu Gly Asp Tyr Ser Phe Asp Asp Trp His Arg Val
100 105 110
Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Phe Tyr Ser Met Lys Tyr Glu Ile
115 120 125
Val Ala Met Leu Arg Ala Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Met Ala Ser
130 135 140
Ile Leu Gly Ser Val Thr Phe Pro Asn Ala Pro Ala Tyr Val Thr Ala
145 150 155 160
Lys His Gly Val Val Gly Met Thr Lys Ser Ala Ala Val Asp Tyr Ala
165 170 175
Lys Lys Gly Ile Arg Val Thr Ala Val Gly Pro Gly Phe Ile Asp Thr
180 185 190
Pro Leu Leu Ser Ala Leu Pro Lys Glu Thr Leu Asp Tyr Leu Lys Ser
195 200 205
Val His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ser Asp Glu Val Ala Ala Leu
210 215 220

Thr Ala Phe Leu Leu Ser Asp Ala Ala Ser Asn Ile Thr Gly Ser Tyr
 225 230 235 240
 His Leu Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Gln
 245 250

<210> 2

<211> 753

<212> DNA

<213> Devosia riboflavina

<400> 2

atg tcc cag gat ttt tca ggc aag gtc gca ttc gta acg ggt ggt gcc 48
 Met Ser Gln Asp Phe Ser Gly Lys Val Ala Phe Val Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 tcg ggc atc ggt gag gcg gtc gtc aag cag ctt gcc gcg cgc ggc gcc 96
 Ser Gly Ile Gly Glu Ala Val Val Lys Gln Leu Ala Ala Arg Gly Ala
 20 25 30
 aag gtt gtg gtt gcc gat ctc aag ctc gaa ggc gcg cag gcg gtt gcc 144
 Lys Val Val Val Ala Asp Leu Lys Leu Glu Gly Ala Gln Ala Val Ala
 35 40 45
 gat gcg gtc aag gcc gcc ggc ggc gaa gcg gcc gcg gta gct gtc gat 192
 Asp Ala Val Lys Ala Ala Gly Gly Glu Ala Ala Ala Val Ala Val Asp
 50 55 60
 gtc gcc aag gcc gat cag gtg gag aag gct gtc cag ttc gcc gtc gac 240

Val Ala Lys Ala Asp Gln Val Glu Lys Ala Val Gln Phe Ala Val Asp
65 70 75 80

acc ttt ggc gcc ctg cat ctg gcg gtc aat aat gcc ggc att ggc ggc 288
Thr Phe Gly Ala Leu His Leu Ala Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Gly
85 90 95

gct tcc gct ccc ctc ggc gat tat tcc ttc gac gac tgg cat agg gtt 336
Ala Ser Ala Pro Leu Gly Asp Tyr Ser Phe Asp Asp Trp His Arg Val
100 105 110

atc gac gtc aat ctc aat tcc gtc ttc tat tcg atg aag tac gag atc 384
Ile Asp Val Asn Leu Asn Ser Val Phe Tyr Ser Met Lys Tyr Glu Ile
115 120 125

gtc gcc atg ctc agg gca ggc ggt ggc gcc atc gtc aac atg gcc tcc 432
Val Ala Met Leu Arg Ala Gly Gly Gly Ala Ile Val Asn Met Ala Ser
130 135 140

atc ctc ggc tcg gtg acc ttt ccc aat gca ccg gcc tat gtc acc gcc 480
Ile Leu Gly Ser Val Thr Phe Pro Asn Ala Pro Ala Tyr Val Thr Ala
145 150 155 160

aag cac ggc gtg gtc ggc atg acc aag tcg gcc gcg gtg gac tat gcc 528
Lys His Gly Val Val Gly Met Thr Lys Ser Ala Ala Val Asp Tyr Ala
165 170 175

aaa aag ggc att cgc gtc acg gcc gtc ggg ccc ggt ttc atc gac acg 576
Lys Lys Gly Ile Arg Val Thr Ala Val Gly Pro Gly Phe Ile Asp Thr

180

185

190

ccg ctc cta tcc gcc ttg ccc aag gaa acc ctg gac tac ctc aaa tcc 624

Pro Leu Leu Ser Ala Leu Pro Lys Glu Thr Leu Asp Tyr Leu Lys Ser

195

200

205

gtc cat ccg atc gga cgg ctg ggt acc tcg gat gaa gtc gca gcg ctg 672

Val His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Thr Ser Asp Glu Val Ala Ala Leu

210

215

220

acc gcg ttc ctg ctc tcc gat gca gcg tcg aac atc acc ggc tcc tat 720

Thr Ala Phe Leu Leu Ser Asp Ala Ala Ser Asn Ile Thr Gly Ser Tyr

225

230

235

240

cac ctg gtc gat ggc ggc tac gtc gcc caa tag

753

His Leu Val Asp Gly Gly Tyr Val Ala Gln

245

250

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明のポリヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図

【図 2】 組換えプラスミド pNTDRG1 の作製方法を示す図。

【書類名】

図面

【図 1】

1 ATGTCCCAGGATTTTTCAGGCAAGGTCGCATTCGTAACGGGTGGTGCCTCGGGCATCGGT 60
M S Q D F S G K V A F V T G G A S G I G

61 GAGGCGGTTCGTCAAGCAGCTTGCCGCGCGCGGCCAAGGTTGTGGTTGCCGATCTCAAG 120
E A V V K Q L A A R G A K V V V A D L K

121 CTCGAAGGCGCGCAGGCGGTTGCCGATGCGGTCAAGGCCGCGCGCGAAGCGGCCGCG 180
L E G A Q A V A D A V K A A G G E A A A

181 GTAGCTGTCGATGTCGCCAAGGCCGATCAGGTGGAGAAGGCTGTCCAGTTCGCCGTCGAC 240
V A V D V A K A D Q V E K A V Q F A V D

241 ACCTTTGGCGCCCTGCATCTGGCGGTCAATAATGCCGGCATTGGCGGCGCTTCCGCTCCC 300
T F G A L H L A V N N A G I G G A S A P

301 CTCGGCGATTATTCCTTCGACGACTGGCATAGGGTTATCGACGTCAATCTCAATTCCGTC 360
L G D Y S F D D W H R V I D V N L N S V

361 TTCTATTCGATGAAGTACGAGATCGTCGCCATGCTCAGGGCAGGCGGTGGCGCCATCGTC 420
F Y S M K Y E I V A M L R A G G G A I V

421 AACATGGCCTCCATCCTCGGCTCGGTGACCTTTCCCAATGCACCGGCCTATGTCACCGCC 480
N M A S I L G S V T F P N A P A Y V T A

481 AAGCACGGCGTGGTCGGCATGACCAAGTCGGCCGCGGTGGACTATGCCAAAAGGGCATT 540
K H G V V G M T K S A A V D Y A K K G I

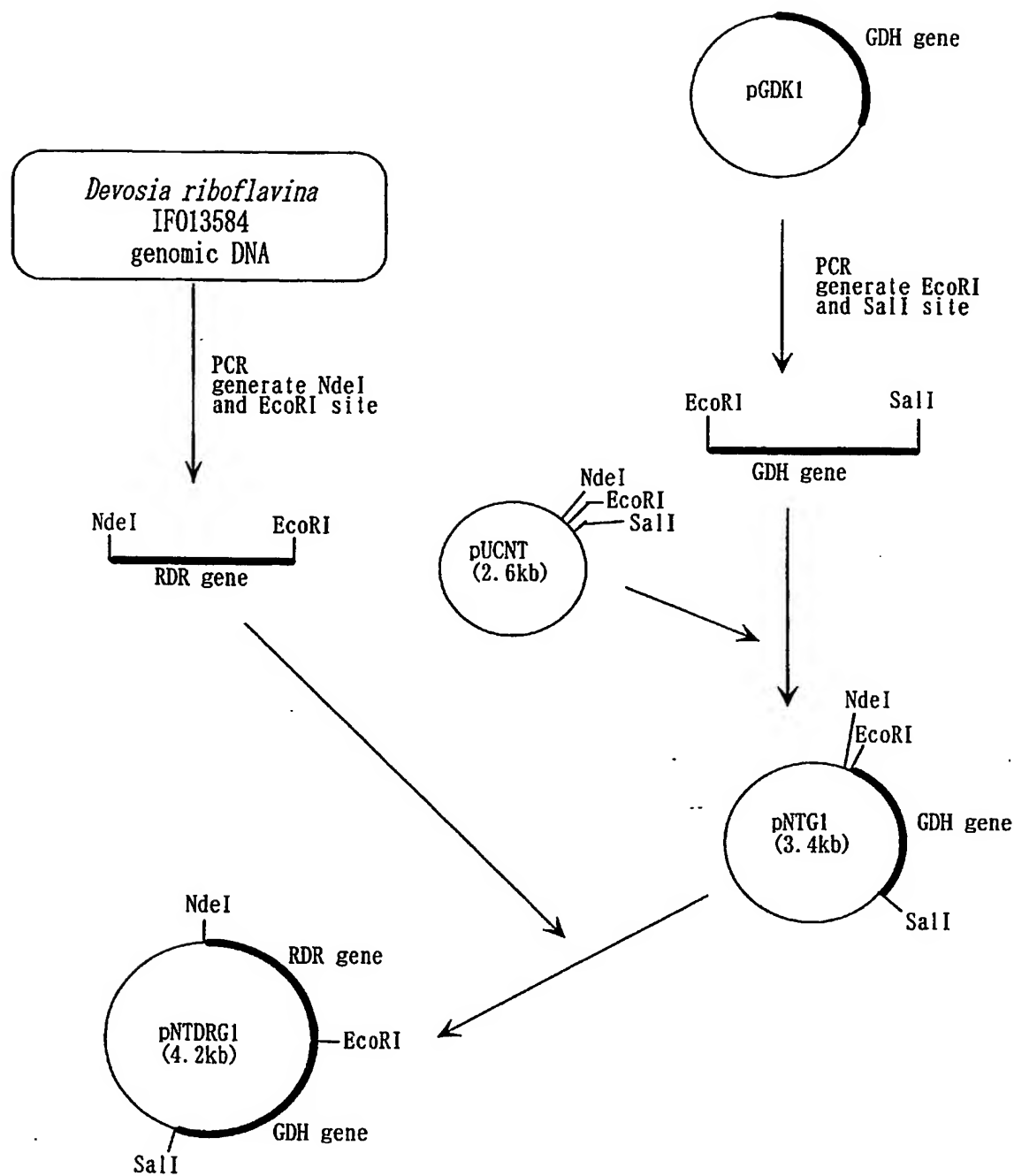
541 CGCGTCACGGCCGTCGGGCCCCGGTTTCATCGACACGCCGCTCCTATCCGCCTTGCCCCAAG 600
R V T A V G P G F I D T P L L S A L P K

601 GAAACCCTGGACTACCTCAAATCCGTCCATCCGATCGGACGGCTGGGTACCTCGGATGAA 660
E T L D Y L K S V H P I G R L G T S D E

661 GTCGCAGCGCTGACCGCGTTCCTGCTCTCCGATGCAGCGTCGAACATCACCGGCTCCTAT 720
V A A L T A F L L S D A A S N I T G S Y

721 CACCTGGTCGATGGCGGCTACGTCGCCCAATAG 753
H L V D G G Y V A Q *

【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 (R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する新規ポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチドおよびその利用方法を提供する。

【解決手段】 以下の(1)から(4)の理化学的性質を有するポリペプチド：

(1) 作用：NADHまたはNADPHを補酵素として、N-ベンジル-3-ピロリジノンに作用し、(R)-N-ベンジル-3-ピロリジノールを生成する、

(2) 作用至適pH：5.5から6.0、

(3) 作用至適温度：50℃から55℃、

(4) 分子量：ゲル濾過分析において約55000、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析において約28000。

または、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド。及び、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリペプチドを高生産する形質転換体。

【選択図】 なし。

特願 2 0 0 2 - 2 7 2 9 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 9 4 1]

1. 変更年月日
[変更理由]

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

新規登録

住 所
氏 名

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
鐘淵化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.